

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program:

Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor:

Molekulární biologie a biochemie organismů



Tomáš Hofman

**Vliv epigenetických modifikací na replikaci a  
transkripci DNA viru hepatitidy B**

Effect of epigenetic modifications on replication and  
transcription of hepatitis B virus DNA.

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Školitel: RNDr. Ivan Hirsch, CSc.

Praha 2016

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 12. 5. 2016

Podpis

Děkuji RNDr. Ivanu Hirschovi, CSc. za cenné rady a připomínky při vypracování bakalářské práce. Dále bych chtěl poděkovat svojí rodině za podporu, bez které by tato práce nemohla vzniknout.

# Obsah

## Seznam zkratek

## Abstrakt

<b>1</b>	<b>Úvod .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Charakteristika viru hepatitidy B .....</b>	<b>2</b>
2.1	Popis virové částice .....	2
2.2	Životní cyklus HBV .....	3
2.3	Léčba .....	4
2.4	Fáze infekce.....	4
2.5	Struktura cccDNA .....	5
<b>3</b>	<b>Epigenetická regulace HBV .....</b>	<b>6</b>
3.1	Metylace CpG .....	6
3.1.1	Metylace HBV cccDNA .....	6
3.1.1.1	CpG ostrov I .....	8
3.1.1.2	CpG ostrov II .....	8
3.1.1.3	CpG ostrov III .....	9
3.1.2	Vliv HBx na DNMT .....	9
3.1.3	Vliv HBc na transkripci HBV .....	9
3.2	Histonové modifikace.....	10
3.2.1	Modifikace cccDNA vazebných histonů .....	12
3.2.1.1	HepG2-NTCP1 .....	13
3.2.1.2	Primární hepatocyty .....	13
3.2.1.3	Vzorky jater infikovaných HBV .....	14
3.2.1.4	Transkripční aktivita HBV v buněčné linii HepG2 a ve vzorcích jater	14
3.2.2	Cytokinová regulace modifikací .....	15

3.2.2.1	Interferon $\alpha$ .....	15
3.2.2.2	Interleukin 6.....	16
3.2.3	Vliv HBx .....	17
3.3	RNA interference.....	19
3.3.1	miRNA blokující replikaci HBV .....	19
3.3.2	miRNA napomáhající replikaci HBV .....	20
<b>4</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>22</b>
<b>5</b>	<b>Seznam použité literatury .....</b>	<b>23</b>

## Seznam zkratek

APOBEC	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like	apolipoprotein B mRNA editující enzym
CBP	CREB binding protein	CREB vazebný protein
cccDNA	covalently closed circularDNA	kruhová kovalentně uzavřená DNA
CHB	chronic hepatitis B	chronická hepatitida B
CpG	cytosin-(phosphate)-guanin dinucleotide	cytosin-(fosfát)-guanin dinukleotid
CpG I, II, III	CpG island I, II, III	CpG ostrov I, II, III
CREB	cAMP response element-binding protein	vazebný protein pro cAMP reagující sekvenci
DNMT	DNA methyltransferase	DNA metyltransferáza
HAT	histon acetyltransferase	histon acetyltransferáza
HBc(Ag)	hepatitis B core (antigen)	kapsidový protein/antigen hepatitidy B
HBeAg	hepatitis B e antigen	e antigen hepatitidy B
HBsAg	hepatitis B surface antigen	povrchový antigen hepatitidy B
HBV	hepatitis B virus	virus hepatitidy B
HBx	hepatitis B x protein	x protein hepatitidy B
HCC	hepatocellular carcinoma	hepatocelulární karcinom
HDAC	histon deacetylase	histon deacetyláza
IFN- $\alpha$	interferon alfa	interferon alfa
IL	interleukine	interleukin
miRNA	micro RNA	mikro RNA
NTCP	Na <sup>+</sup> /taurocholate cotransporting polypeptide	Na <sup>+</sup> /taurocholátový kotransportní polypeptid
pgRNA	pregenomicRNA	pregenomová RNA
PRC2	polycomb repressive complex 2	polycomb represivní komplex 2
SP1	surface promotor 1	promotor povrchového proteinu
WHO	World Health Organization	Světová zdravotnická organizace

## Abstrakt

Virus hepatitidy B vytváří v jádrech infikovaných hepatocytů stabilní cccDNA odolnou vůči degradaci se schopností perzistence po mnoho let. Hlavní roli v perzistenci cccDNA hrají epigenetické mechanismy regulující transkripci a replikaci v různých fázích infekce. Mezi hlavní regulační epigenetické mechanismy HBV patří metylace CpG ostrovů, acetylace a metylace cccDNA vazných histonů a RNA interference. Methylace CpG je spojena s interakcí kapsidového proteinu, jehož vazba na cccDNA podporuje transkripci a odlišuje tak strukturně virový genom od hostitelského. X protein kromě metylace CpG ovlivňuje hlavně histonové modifikace interakcí s hostitelskými proteiny, čímž je schopen vyřadit inhibiční vlivy a podpořit virovou transkripci aktivačními modifikacemi. Tato práce shrnuje dosavadní poznatky týkající se epigenetické regulace cccDNA.

**Klíčová slova:** HBV, cccDNA, replikace a transkripce HBV DNA, histonové modifikace, metylace CpG, CpG ostrovy, HBx, HBc, IFN $\alpha$ , IL-6

## Abstrakt

The hepatitis B virus forms in a nuclei of infected hepatocytes a stable cccDNA resistant to degradation and capable to persist for many years. The main role in the persistence of cccDNA play the epigenetic mechanisms that regulates viral transcription and replication in various stages of the infection. Major epigenetic mechanisms involved in the regulation of HBV include CpG islands methylation, cccDNA-bound histone acetylation and methylation and RNA interference. CpG methylation is associated with the activity of capsid protein, which binds to the cccDNA and promotes transcription and structurally distinguishes viral and the host genome. HBx protein besides CpG methylation mainly affects histone modifications via its interaction with host proteins and thus eliminates the inhibitory effects and promotes the active modifications favoring virus transcription. This work summarizes current knowledges concerning the cccDNA epigenetic regulation.

**Klíčová slova:** HBV, cccDNA, replication and transcription of HBV DNA, histone modifications, methylation of CpG, CpG islands, HBx, HBc, IFN $\alpha$ , IL-6

# 1 Úvod

Virus hepatitidy B (HBV) je malý obalený DNA virus z čeledi Hepadnaviridae, který se replikuje prostřednictvím RNA intermediátu a vyžaduje tak pro dokončení svého replikačního cyklu reverzní transkriptázu. HBV je sám o sobě necytolytický virus, ale u jím infikovaných hepatocytů výrazně zvyšuje riziko hepatocelulárního karcinomu (HCC) a rozvoje fibrózy a cirhózy jater. Za vzniklé poškození jater je zodpovědný pouze hostitelský imunitní systém.

I přesto, že je již od roku 1982 dostupná účinná vakcína, HBV stále zůstává jedním z nejzávažnějších lidských onemocnění. Celosvětově je chronicky infikováno přes 240 milionů lidí a každoročně na následky tohoto onemocnění umírá 780 000 lidí. Až u 90% perinatálně infikovaných dětí se vyvine chronická infekce. Zcela opačné je tomu u dospělých jedinců, u kterých se samo z infekce vyléčí přes 90% nakažených.

Současná léčba zahrnuje inhibici replikace HBV. Chceme-li dosáhnout úplného vyléčení, jedinou dosavadní možností je zničení templátové DNA. Zde se však setkáváme s mnoha obtížemi. Po infekci totiž HBV v jádrech hepatocytů vytváří vysoce stabilní episomální kovalentně uzavřenou kruhovou DNA (cccDNA), která je odolná vůči degradaci a dokáže v jádře persistovat mnoho let. Tato schopnost persistence je utvrzena možností metylace virové DNA a také interakcemi s jadernými proteiny. Díky tomu získává strukturu chromatinu a její transkripční aktivita a replikace je tak regulována skrze epigenetické modifikace, stejně jako je tomu u hostitelské DNA. Hlavními epigenetickými modifikacemi popsány u HBV je metylace CpG ostrovů, acetylace a metylace cccDNA vázaných histonů a RNA interference.

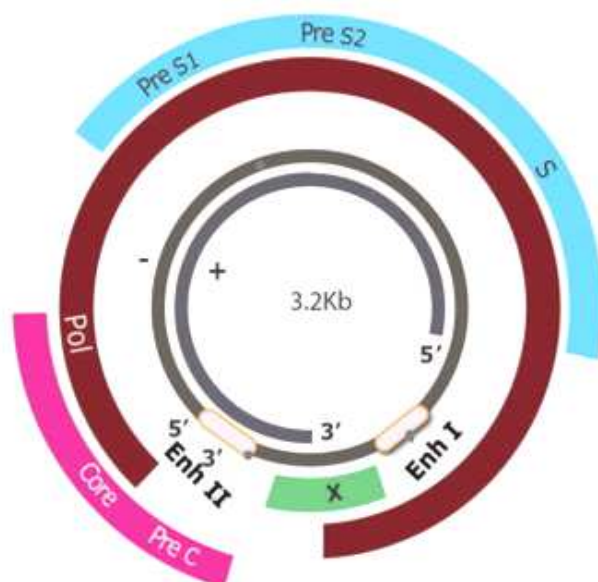
Cílem této práce je shrnout dosavadní poznatky o epigenetické regulaci HBV, objasnit jejich vliv na virovou produkci a replikaci v různých fázích infekce. Dalším cílem je popsat vliv virových proteinů a cytokinů na modifikace cccDNA s možnostmi výsledné degradace cccDNA.



## 2 Charakteristika viru hepatitidy B

### 2.1 Popis virové částice

Celková velikost infekčního virionu nesoucí genom je 42 nm. HBV genom je asi 3,2 kb dlouhý, obsahuje čtyři otevřené čtecí rámce, které se v genomu navzájem překrývají (Obrázek č. 1), a celkem kóduje 7 proteinů. *PreCore/Core* vede ke vzniku kapsidového proteinu (HBc), což je jediný protein formující kapsidu, a E antigenu (HBeAg), jehož vysoké hladiny značí vysokou viremii. *PreS1/PreS2/S* kóduje malý (S), střední (M) a velký (L) povrchový protein (HbsAg). Dalším proteinem je reverzní traskriptáza kódovaná genem (*pol*) a nakonec *X* gen kódující vysoce pleiotropní X protein (HBx), který má široké pole působnosti a je důležitý pro replikaci a transkripci HBV (Seeger & Mason, 2015).

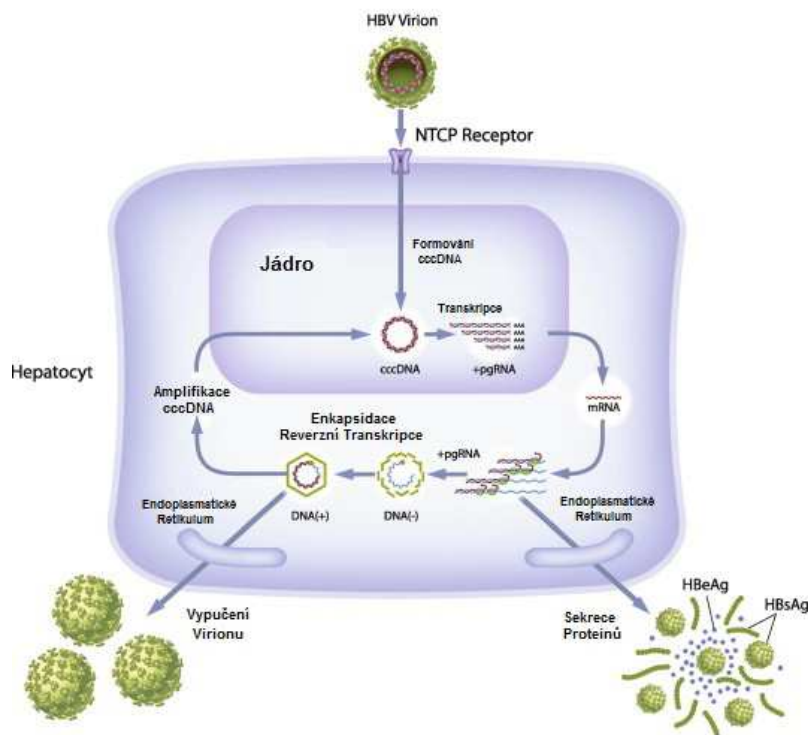


**Obrázek č. 1 Genom HBV**

Virová částice je dvojvláknová DNA, která kóduje celkem sedm proteinů, obsahuje 4 vzájemně se přesahující čtecí rámce (ORF). První ORF je pro povrchové proteiny (*PreS1*, *PreS2*, *S*), druhý pro reverzní traskriptázu (*Pol*), třetí pro protein X (*X*) a poslední je pro kapsidový protein a e antigen (*Core*, *PreC*). Enhancer I a II (*Enh I*, *Enh II*) jsou důležité regulační oblasti genomu. Čtecí rámce jsou barevně odlišené (upraveno Shlomai et al., 2014).

## 2.2 Životní cyklus HBV

HBV je přenosný jak přímým, tak nepřímým kontaktem s krví a s ostatními tělesnými tekutinami. Infekci lze přenést přes kůži, sliznici a též při kojení. Nejčastěji se však přenáší perinatálně z matky na dítě, nebo přímým kontaktem s nakaženou krví ("WHO | Hepatitis B," 2016). Poté, co se virion dostane do krevního oběhu a skrze Disseho prostor v jaterním endotelu se dostane k hepatocytům, se jeho PreS1 doména velkého povrchového proteinu naváže na Na<sup>+</sup>/taurocholátový kotransportní polypeptid (NTCP) lokalizovaný na povrchu hepatocytů, což je specifický receptor pro HBV (Obrázek č. 2) (Lempp & Urban, 2014; Yan et al., 2012). Následuje vstup virionu do buňky a následný transport genomu do jádra, kde vytváří pomocí reparačního buněčného systému stabilní kruhovou kovalentně uzavřenou DNA (cccDNA). Pomocí hostitelského aparátu dochází k syntéze virových mRNA a též pregenomové RNA (pgRNA). Jakmile jsou virové proteiny nasyntetizovány, dochází k enkapsidaci pgRNA spolu s reverzní transkriptázou a následné syntéze DNA, avšak ne všechny kapsidy jsou následně obaleny a sekretovány ven z buňky. Malá část se vrací zpět do jádra, čímž zvýší počet cccDNA v jádře a tím i transkripci virových proteinů (Gish et al., 2015; Seeger & Mason, 2015).



Obrázek č. 2 Životní cyklus HBV (upraveno Gish et al., 2015)

## 2.3 Léčba

První a nejčastější možností je léčba pomocí Tenofoviru, Entecaviru nebo jiných nukleotidových analogů, které zablokují virovou polymerázu a tím i replikaci viru. Tyto látky však nezbaví hepatocyty cccDNA a musí být užívány po zbytek života ("WHO | Hepatitis B," 2016). Druhou možností a léčbou v pravém slova smyslu je podávání nukleotidových analogů, avšak tentokrát spolu s pegylovaným interferonem  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ). Ten cíleně působí na cccDNA přes buňčný protein APOBEC3A, který deaminuje cccDNA a tím ji degraduje (Lucifora et al., 2014), bez cytotoxického účinku na hepatocyty. Interferon má však silné vedlejší účinky, proto je snahou biomedicínského výzkumu najít jinou cestu jak aktivovat APOBEC3A a cíleně zničit HBV cccDNA, bez vedlejších účinků interferonu. Alternativou je nově objevený mechanismus degradace cccDNA pomocí Smc5/6 komplexu. Tento chromozomální protein účinně blokuje transkripci z extrachromozomální DNA její restrikcí. Transkripce HBV cccDNA však není tímto mechanismem ovlivněna. Toho je dosaženo vazbou HBx na DDB1 E3 ubiquitin ligázu, která degraduje Smc5/6 komplex. Vyřazení této zásadní protektivní role HBx by mohlo být klíčem k následné eradikaci cccDNA (Decorsière et al., 2016).

## 2.4 Fáze infekce

Infekci HBV můžeme rozdělit do fáze akutní, chronické a okultní. Akutní infekce je definována přítomností HBsAg, protilátek proti HBcAg a vysokými hladinami HBeAg, značící vysokou replikaci HBV. Pouze malá část pacientů s akutní infekcí HBV však umírá na selhání jater. Chronická infekce (CHB), jež je definovaná přítomností HBsAg po více jak 6 měsíců, se vyvíjí u <10% akutně infikovaných dospělých jedinců. Naproti tomu u >60% kojenců a dětí do šesti let se chronická infekce vyvine z důvodu nezralosti imunitního systému a vytvoření tolerance k HBV. Výsledkem chronické infekce je pak rozvinutí cirhózy a fibrózy jater a vznik HCC ("WHO | Hepatitis B," 2016).

Zvláštním případem je takzvaná okultní fáze infekce, definovaná dlouhotrvajícím přetrváváním cccDNA v jádře hepatocytů u jedinců, u nichž nebyl detekován HBsAg. HBV DNA je replikace schopná, avšak její transkripce ani replikace neprobíhá, jak je usuzováno z nízkých až nedetekovatelných hladin HBV DNA v séru, což naznačuje silnou inhibici cccDNA. Tato inhibice může být a pravděpodobně i je z velké části zprostředkována epigenetickými modifikacemi (Raimondo et al., 2008, 2013).

## 2.5 Struktura cccDNA

Jak již bylo zmíněno, maturovaný virion HBV obsahuje částečně dvouvláknovou relaxovanou cirkulární DNA (rcDNA). Poté, co je hepatocyt infikován a virový genom je dopraven do jádra, se v prvním kroku pomocí hostitelských opravných mechanismů dosyntetizuje zbytek (+) vlákna DNA a tím vzniká stabilní cccDNA forma. Tato cccDNA forma byla popsána i u jiných DNA virů, jako je například virus Epstein-Barrové (Shaw et al., 1979), lidský a boviní papillomavirus (Favre et al., 1977), adenovirus (Tate & Philipson, 1979), SV40 nebo polyomavirus (Cremisi et al., 1975). V druhém kroku již hotová cccDNA interaguje s hostitelskými histony a nehistonovými proteiny a vytváří tak nukleosomy s výslednou podobou minichromozomu (Bock et al., 1994; 2001). Na výsledné struktuře minichromozomu HBV se však nepodílí pouze hostitelské proteiny, ale i virový kapsidový protein (HBc) a protein X (HBx), které ovlivňují vazbu dalších proteinů a transkripčních faktorů (Belloni et al., 2009; Guo, et al., 2011a).

## 3 Epigenetická regulace HBV

Epigenetika, se zabývá odlišnostmi genové exprese a tím i výsledného fenotypu, které nevyplývají ze změny sekvence DNA, ze které je daný gen exprimován. Tato variabilita exprese je zprostředkována epigenetickými modifikacemi buď samotné DNA, nebo DNA vazebných proteinů. Hlavními a nejvíce popsányi epigenetickými modifikacemi je metylace cytosinu v CpG oblastech bohatých na dinukleotidy CpG (CpG ostrovy), acetylace a metylace histonů a v neposlední řadě též RNA interference pomocí mikroRNA (miRNA).

Jelikož i genom HBV obsahuje CpG bohaté oblasti a interaguje s hostitelskými proteiny (Bock et al., 2001), tak i on podléhá epigenetickým modifikacím regulující virovou produkci a replikaci (Mogul et al., 2011; Vivekanandan et al., 2009).

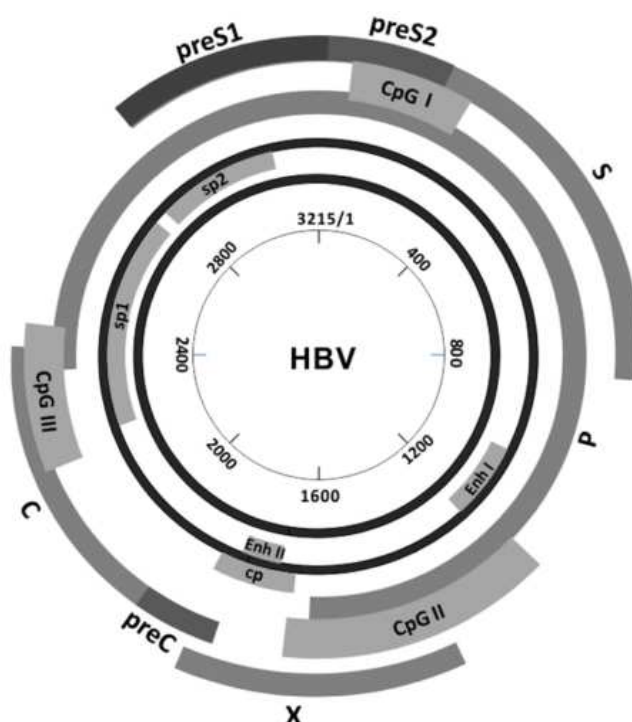
### 3.1 Methylace CpG

Methylace je proces, při kterém dochází k přenosu metylové skupiny z S-adenosyl-L-metioninu na cytosin nejčastěji v CpG dinukleotidu. Tento přenos je katalyzován DNA methyltransferázou (DNMT). Obecně methylace CpG vede ke snížení exprese daného genu. Tato transkripční represe je zprostředkována dále vazbou metyl-CpG vazebných proteinů (Boyes & Bird, 1991) a histon-deacetyláz (HDAC), které způsobí lokální kondenzaci chromatinu, umlčení a znemožnění přístupu k danému genu (Jones et al., 1998). V lidském genomu se tato CpG metylační místa hojně vyskytují v promotorech, čímž regulují expresi přilehlých genů. (Larsen et al., 1992; Vavouri & Lehner, 2012)

#### 3.1.1 Methylace HBV cccDNA

Genom HBV obsahuje tři konvenční CpG ostrovy, které jsou v různé míře metylovány. První CpG ostrov (CpG I) překrývá začátek genu pro povrchový protein (S), druhý CpG ostrov (CpG II) překrývá regulační enhancer I a II, promotor X proteinu a je v těsné blízkosti promotoru pro kapsidový protein. Třetí CpG ostrov (CpG III) překrývá začátek genu pro polymerázu a též promotor pro povrchový protein (SP1) (Obrázek č. 3)(Vivekanandan et al., 2008a). CpG II a III se vyskytují ve všech doposud známých genotypech, naproti tomu CpG ostrov I se vyskytuje pouze v některých genotypech, popřípadě je zkrácen, což vede k jeho ztrátě. Dále byly identifikovány ještě 3 nové CpG

strovy, jejichž zastoupení se liší v závislosti na genotypu HBV, avšak jejich role ještě není zcela objasněna (Zhang et al., 2013a).



**Obrázek č. 3** Znáznornění tří konvenčních CpG ostrovů v genomu HBV. Schéma ukazuje přibližnou pozici CpG ostrovů (CpG I, CpG II, CpG III), promotorů (*SP1*, *SP2*, *CP*), enhancerů (*Enh I*, *Enh II*) a čtyř otevřených čtecích rámců (*preS1/preS2/S*, *X*, *P*, *preC/C*) (Zhang et al., 2014a).

Již několik studií dokázalo, že HBV cccDNA v játrech je metylována a snižuje tím virovou produkci a replikaci viru. To bylo potvrzeno jak pokusy in vitro, kdy buňky transfekované nemetylovanou, částečně metylovanou a plně metylovanou cccDNA vykazovaly snižující se míru transkripce virových proteinů (Guo et al., 2009; Vivekanandan et al., 2008a, 2009), tak i na myším modelu s integrovaným metylovaným HBV genomem (Araki et al., 1989). Tato myš neprodukovala za normálního stavu žádné virové proteiny. Pouze po přidání demetylačního činidla 5-azacytidinu se spustila produkce virových proteinů, v důsledku snížení hladiny metylované HBV DNA.

Metylační profil jednotlivých CpG ostrovů cccDNA u pacientů s CHB ukázal, že nejčastěji je metylován CpG II a III, zatím co CpG I je téměř nemetylovaný. Míra a místo metylace však závisí na mnoha faktorech, jako je stáří pacienta, genotyp HBV, stádium fibrózy a cirhózy jater a další, které hrají významnou roli v metylaci a je třeba je brát v

potaz při výsledném vyhodnocování. Například z porovnání výsledků metylace genotypu B a C je zřejmé, že genotyp C má 2 krát více metylovaný CpG II, což též odráží znatelnější pokles virové produkce oproti genotypu B. U pacientů s pokročilou fibrózou jater, byla nalezena víc jak 2 krát větší metylace CpG II a CpG III oproti pacientům s nízkým stupněm fibrózy (Zhang et al., 2014a). Studie Kim et al., (2011) ukázala souvislost míry metylace s věkem pacienta. U testovaných pacientů s cirhózou jater způsobenou HBV studie zjistila, že metylace není nijak specifická pro jednotlivý CpG ostrov. Vyšší míra metylace je však spojena s postupujícím věkem pacienta a trváním nemoci, což naznačuje, že metylace HBV se v průběhu infekce akumuluje.

#### **3.1.1.1 CpG ostrov I**

CpG I bývá oproti CpG II a CpG III zřídka metylován, jediní pacienti s CHB ze studie Zhang et al., (2014a), kteří měli CpG I metylovaný, byli v ti pokročilém stádiu fibrózy jater. Vysoká metylace CpG I je nejčastěji spojována s integrací HBV DNA do genomu pacienta a s HCC. Také testování buněčné linie Hep3B, která již nese integrovaný genom HBV, odhalilo, že CpG I je silně metylován, zatím co CpG II metylován není (Vivekanandan et al., 2008a). U cccDNA s pouze metylovaným CpG I nedošlo nijak významně k ovlivnění virové transkripce a replikace in vitro. Byl detekován pouze slabý pokles transkripce povrchových proteinů (Zhang et al., 2014a).

#### **3.1.1.2 CpG ostrov II**

Zaměříme-li se na metylaci CpG II v CHB, pak největší míru metylace nacházíme u HBeAg negativních pacientů a u pacientů s nízkým titrem HBV DNA v periferní krvi (Guo et al., 2009). Tyto nízké hladiny jsou důsledkem blízkosti CpG II k promotoru pro kapsidový protein (Obrázek č. 3), ze kterého je také zahájena právě syntéza preCore RNA (HBeAg) a pgRNA (HBV DNA). Díky společnému promotoru je tak hladina HBeAg pozitivně spjata s hladinou HBV DNA. Methylace CpG II tak snižuje virovou replikaci a ve výsledku i celkovou virovou produkci. Díky tomu tak můžeme CpG II označit za klíčovou metylačně-regulační oblast genomu HBV. S tímto zřejmě souvisí fakt, že v průběhu okultní fáze infekce je nejvíce metylován CpG II, čímž ještě spolu s histonovými modifikacemi transkripčně umlčí cccDNA, která v tomto stavu persistuje až do doby reaktivace (Vivekanandan et al., 2008a, 2008b; Zhang et al., 2014a).

### 3.1.1.3 CpG ostrov III

Při srovnání methylace CpG III spolu s množstvím produkovaného HBsAg zjistíme, že u pacientů s nízkými hladinami HBsAg se nachází větší míra metylace CpG III, což je v souladu s faktem, že CpG III překrývá *SP1*. Tím by nízká hladina HBsAg mohla sloužit jako potencionální marker pro metylaci CpG III. Avšak transfekce buněk cccDNA, s pouze metylovaným CpG III, neukázala výraznou změnu hladin HBsAg. Vysvětlením je pravděpodobně nutnost určité ko-methylace CpG II, která u pacientů byla pozorována (Zhang et al., 2014a).

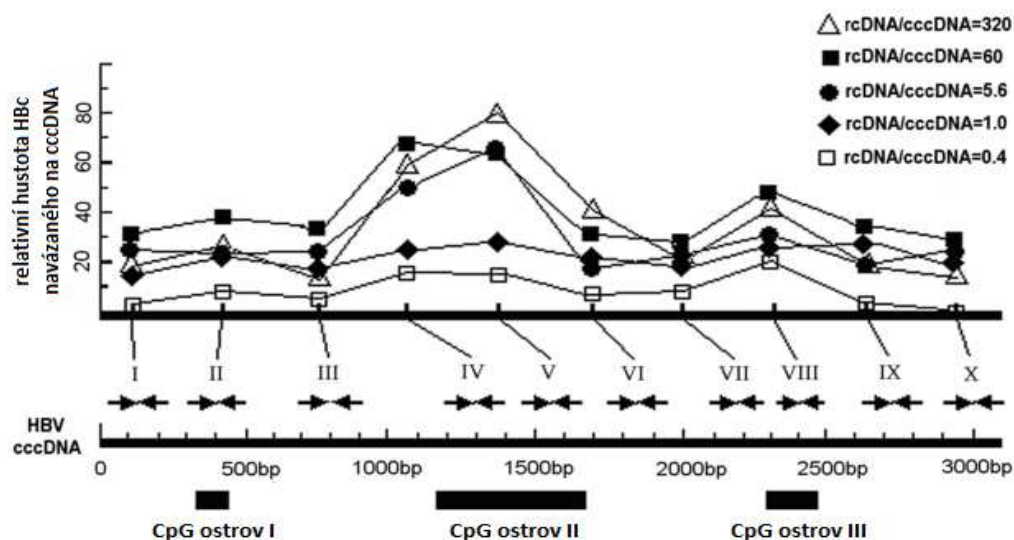
### 3.1.2 Vliv HBx na DNMT

Methylace je kromě transkripčně regulační funkce též obranný mechanismus buňky vůči přítomnosti cizí DNA. Po vstupu HBV do buňky tak dochází k zvýšení exprese všech DNMT, kterétím mají vyšší šanci metylovat virovou DNA a zabránit replikaci viru. Methylace však nemusí být pouze k prospěchu buňky, jelikož nejen virová ale i hostitelská DNA je po infekci metylována *de novo*, za kterou je zodpovědná DNMT3A (Vivekanandan et al., 2010). HBx, jakožto pleiotropní protein nezbytný pro replikaci viru, je schopný interagovat s mnoha hostitelskými proteiny a měnit tak vnitřní prostředí buňky ve prospěch viru (Lucifora et al., 2011; Shon et al., 2009). Bylo popsáno, že HBx mimo jiné přímo interaguje s DNMT3A a tím cíleně metyluje hostitelské CpG v promotorech genů (Zheng et al., 2009). HBx tak můžeme označit jako virový onkogen, jelikož je schopen skrze interakci s DNMT3A cíleně umlčet tumor supresorové geny. To bylo dokázáno u pacientů s HCC, kteří měli oproti zdravým pacientům vyšší hladiny metylovaných genů přispívající ke karcinogenezi jater. HBx tím tak výrazně přispívá ke vzniku HCC (Zhu et al., 2010).

### 3.1.3 Vliv HBc na transkripci HBV

HBc jakožto hlavní protein formující kapsidu byl popsán i jako strukturní součást HBV cccDNA minichromozomu (Bock et al., 2001). Jeho vazba na cccDNA má pozitivní vliv na transkripci a replikaci HBV. Nejvíce se HBc váže na CpG II regulační oblast genomu HBV, kde je jeho množství podmíněné hypometylací cccDNA. Vazba HBc na CpG II tak pravděpodobně brání účinkům DNMT a udržuje ostrov hypometylovaný a transkripčně přístupný. Důležitost HBc pro replikaci dokazuje jeho vysoké zastoupení na CpG II u viremických pacientů (Obrázek č. 4)(Guo et al., 2011a).





**Obrázek č. 4** Množství navázaného HBc na cccDNA u vzorků jater pěti pacientů s různým poměrem rcDNA/cccDNA. Vysoké množství navázaného HBc nacházíme u pacientů s velkým poměrem rcDNA/cccDNA značící velkou replikaci HBV. I až X udávají místa primerů pro qPCR (Guo et al., 2011).

HBc však nemá vliv pouze na metylaci cccDNA. Specifická degradace HBc pomocí hostelské NIRF ubiquitin ligázy inhibující HBV replikaci totiž vede i ke snížení množství aktivní histonové modifikace, a sice acetylace histonů H3 (Qian et al., 2012, 2015). Stejných výsledků dosáhla studie Belloni et al., 2014 u buněčné linie HepAD38 stabilně exprimující HBV, kde léčba inhibitory HBc blokující skládání kapsid též vyústila ke snížení množství HBc navázaného na cccDNA, k redukci acetylace histonu H3 a celkově inhibici replikace. Ve výsledku tak můžeme říci, že HBc chrání cccDNA před transkripční inhibicí ze strany DNMT a HDAC a podporuje její transkripci vhodnými epigenetickými mechanismy, například vazbou histon acetyltransferáz (Xiang et al., 2015).

## 3.2 Histonové modifikace

Histony jsou jaderné proteiny mající důležitou roli ve struktuře chromatinu. Oktamer histonů H3, H4, H2A a H2B spolu dohromady tvoří jádro nukleosomu, kolem kterého je pak navinuta DNA. Struktura histonů je až na N terminální konec globulární. Cílem histonových modifikací je pak nejčastěji lysin (Tabulka č. 1) na již zmíněném N-terminálním konci, který vystupuje z jádra nukleosomu. Jsou však popsány i modifikace postihující globulární část histonů (Tropberger et al., 2013). Tyto modifikace pak významně ovlivňují výslednou strukturu chromatinu a tím i jeho transkripční

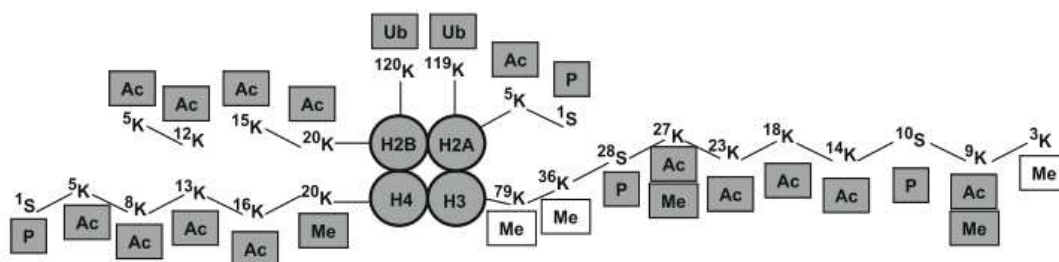
aktivitu. Mezi hlavní posttranskripční modifikace histonů patří acetylace (Ac) a metylace (Me). Enzymy umožňující tyto modifikace jsou histon acetyl transferázy (HAT), histon deacetylázy (HDAC), histon metyltransferázy (HMT) a histon demetylázy (HDMT). Methylace histonů nemá jednotný vliv a je spojena jak s aktivací, tak s inhibicí transkripce. Hyperacetylace díky HAT je spojena s rozvolněním chromatinu a s aktivací transkripce. Opačně je tomu u hypoacetylace díky HDAC, která je spojena s kondenzací chromatinu a transkripčním umlčením úseku. Tato regulace transkripce není způsobena pouze samostatnou modifikací, ale i vazbou chromatin remodelujících proteinů a transkripčních faktorů, které se díky tomu mohou na DNA navázat.

Dalšími modifikacemi jsou například fosforylace (P), ubiquitylance (Ub), sumoylace (Su), ADP-ribosylace, deiminace a izomerie prolinu. Seznam většiny histonových modifikací je shrnut v tabulce (Tabulka č. 1) a znázorněn na obrázku (Obrázek č. 5). Všechny mají patrně vliv na regulaci transkripce, avšak některé hrají roli i v reparačních mechanismech DNA, v kondenzaci chromatinu nebo replikaci. Panuje zde i vzájemný vztah, kdy jedna modifikace ovlivňuje druhou nebo její funkce je podmíněna další modifikací (Kouzarides, 2007; Levrero et al., 2009).

Typ modifikace	Místo	Transkripce
Acetylace lysinu (K Ac)	H3 (9, 14, 18, 27, 56, 122) H4 (5, 8, 13, 16) H2A, H2B	Aktivace
Fosforylace serinu/threoninu (S/T)	H3 (3, 10, 28) H2A, H2B	Aktivace
Methylace argininu (R Me)	H3 (17, 23), H4 (3)	Aktivace
Methylace lysinu (K Me)	H3 (4, 36, 79) H3 (9, 27), H4 (20)	Aktivace Inhibice
Ubiquitylance lysinu (K Ub)	H2B (120) H2A (119)	Aktivace Inhibice
Sumoylace lysinu (K Su)	H2B (6/7), H2A (126)	Inhibice
ADP ribosylace (E-ar)	H3, H4, H2A/B	Aktivace *
Deiminace argininu (R) na citrulin (Cit)	H3 (2, 8, 17, 26) H2A (3), H4 (3)	Inhibice **
Prolin izomerace (P cis > P trans)	H3 (30, 38)	Inhibice ***

**Tabulka č. 1** Seznam známých histonových post-transkripčních modifikací, jejich vliv na transkripci a místo, na kterém daná modifikace nachází (Levrero et al., 2009).

\* (Hassa et al., 2006), \*\* (Thompson & Fast, 2006), \*\*\* (Kouzarides, 2007)



**Obrázek č. 5** Schématické znázornění nukleosomu a N-terminálních konců histonů s pořadím jednotlivých aminokyselin spolu s častými modifikacemi. Nejčastější modifikací je acetylace a nejvíce modifikovaným histonem je histon H3 a H4 (Levero et al., 2009).

### 3.2.1 Modifikace cccDNA vazebných histonů

Jelikož i genom HBV interaguje s histony, tak i jeho transkripce je do značné míry ovlivněna těmito modifikacemi. Můžeme tedy předpokládat, že vliv modifikací histonů na cccDNA bude stejný jako u DNA hostitelských buněk. Imunoprecipitační metody ukázaly, že histony H3 a H4 jsou na cccDNA acetylovány. Jejich hyperacetylace je spojena s vysokou replikací cccDNA a přítomností P300/CBP acetyláz u pacientů s CHB. Hypoacetylaci spolu s přítomností HDAC1 nacházíme u pacientů s nízkými hladinami HBV DNA. Důležitost acetylace v regulaci transkripce a replikace byla potvrzena u buněčné linie Huh7 transfekované HBV cccDNA spolu s inhibitory HDAC1, což vedlo k acetylaci H3 a H4 spojenou s nárůstem HBV DNA a HBV transkriptů (Pollicino et al., 2006).

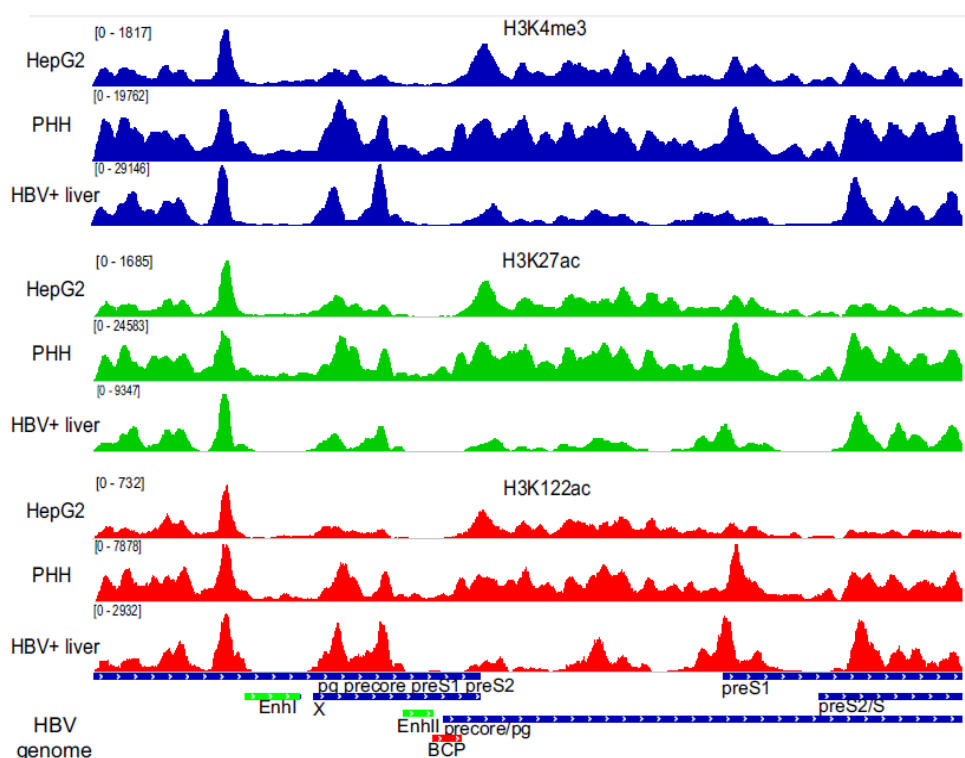
Histony mohou nést jak transkripčně aktivní, tak inhibiční modifikace. Studie Tropberger et al., 2015 se zaměřila na acetylaci a metylaci histonu H3 a zmapovala tak celogenomově vybrané modifikace na cccDNA. Mezi zkoumané modifikace spojené s aktivní transkripcí patří trimetylace lysinu 4 (H3K4me3) a 36 (H3K36me3) a acetylace lysinu 27 (H3K27ac) a 122 (H3K122ac). Inhibičními značkami byly trimetylace lysinu 9 (H3K9me3) a 27 (H3K27me3). Tyto značky byly zmapovány a porovnány u primárních hepatocytů, vzorků jater pacientů s CHB a buněčné linie HepG2-NTCP1. Všechny tyto systémy vykazovaly velmi podobnou distribuci a množství aktivních značek H3K4me3, H3K27ac a H3K122ac (Obrázek č. 6) s drobnými rozdíly v jejich hustotě a velmi nízké, či téměř žádné inhibiční značky H3K9me3 a H3K27me3. Hladiny aktivních modifikací v porovnání s lidským chromatinem odpovídají transkripčně aktivním promotorům. V genomu HBV se nachází dvě místa téměř zbavená nukleosomu. Jedná se o regulační Enhancer I a Enhancer II překrývající důležitý preCore/pgRNA promoter.

### 3.2.1.1 HepG2-NTCP1

Buňky HepG2 transfekované NTCP1, receptorem pro HBV, vykazují nejvyšší hustotu aktivních značek před Enhacerem I, a za promotorem pro kapsidový protein (preCore/pgRNA promoter), což vypovídá o jeho vysoké transkripční aktivitě a důležitosti při infekci *de novo* (Obrázek č. 6) (Tropberger et al., 2015).

### 3.2.1.2 Primární hepatocyty

U primárních hepatocytů infikovaných HBV nacházíme vysoké množství aktivních značek podél celého virového genomu. Kromě vysoké hustoty aktivních značek poblíž enhancerů, nacházíme značnou hustotu i poblíž *preS1* a *X* promotoru. Úsek *Enhanceru I*, *Enhanceru II* a *preS2* není úplně zbaven nukleosomu, nicméně jejich hustota je zde výrazně menší (Obrázek č. 6). Tento rozdíl v acetylaci odpovídá poznatkům, že primární hepatocyty produkují větší množství HBsAg oproti buněčné linii HepG2 (Tropberger et al., 2015).



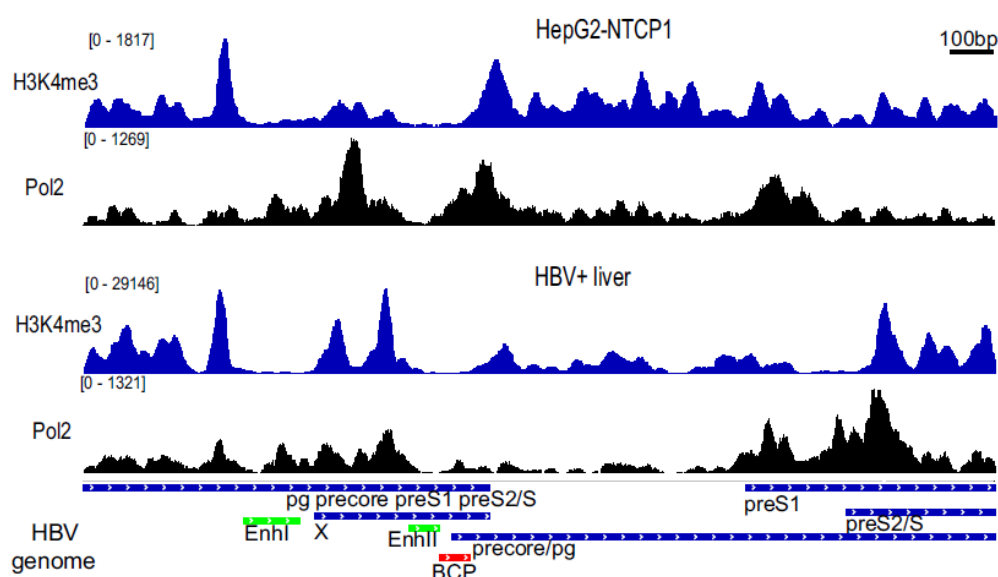
**Obrázek č. 6** Rozmístění tří aktivačních histonových modifikací H3K4me3 (modře), H3K27ac (zeleně) a H3K122ac (červeně) v genomu HBV (dole). Porovnání míry hustot (osa y) v buňkách HepG2-NTCP1 s primárními lidskými hepatocyty (PHH) a se vzorky jater infikovaných HBV (HBV+ liver). BCP: preCore/pgRNA promotor (Tropberger et al., 2015).

### 3.2.1.3 Vzorky jater infikovaných HBV

Vzorky jater infikovaných HBV vykazují v porovnání s primárními hepatocyty mnohem nižší hustotu aktivních značek. Jejich distribuce je ale i tak podobná předchozím dvěma systémům. Nejvyšší hustoty nacházíme opět před Enhancerem I, dále pak u začátku *preS2* genu a rámci genu pro X protein. Přilehlé úseky jsou také téměř zbaveny nukleosomu, konkrétně Enhancer I, EnhancerII spolu s preCore/pgRNA promotorema začátek *preS2* genu (Obrázek č. 6) (Tropberger et al., 2015).

### 3.2.1.4 Transkripční aktivita HBV v buněčné linii HepG2 a ve vzorcích jater

U buněčné linie HepG2-NTCP1 a vzorků jater byla zjišťována transkripční aktivita pomocí detekce RNA polymerázy II vázané v daném úseku. U buněčné linie HepG2-NTCP1 byly detekovány tři místa s vysokou hustotou RNA polymerázy II (RNA Pol II) v oblastech mezi Enhancerem I a II, na preCore/pgRNA promotoru a blízko *preS1* (Obrázek č. 7). Nejvyšší shoda v hustotě RNA Pol II spolu s vysokým množstvím aktivní značky H3K4me3 se nachází v oblasti preCore/pgRNA promotoru značící jeho vysokou transkripční aktivitu v *de novo* infekci HepG2-NTCP1 (Tropberger et al., 2015).



**Obrázek č. 7** Rozmístění a hustota RNA Pol II (černě) v porovnání aktivační histonové modifikace H3K4me3 (modře) v buněčné linii HepG2-NTCP1 (nahore) a ve vzorcích jater pacientů s CHB (dole). Nejvyšší shodu hustot nacházíme u preCore/pgRNA promotor u HepG2-NTCP1 a u preS2/S ve vzorcích jater. BCP: preCore/pgRNA promotor (Tropberger et al., 2015).

Vzorky jater infikovaných HBV vykazují odlišnou míru hustoty a lokalizaci RNA Pol II. Nejvyšší shodu vysokých hustot H3K4me3 a RNA Pol II nacházíme na začátku *preS2/S* genu, potvrzující vysokou produkci HBsAg. Hustota vazby RNA Pol II na preCore/pgRNA promotoru je oproti buněčné linii velmi malá (Obrázek č. 7). Pomocí hustoty aktivních histonových modifikací spolu se zastoupením RNA Pol II tak můžeme předpovědět transkripční aktivitu úseku (Tropberger et al., 2015).

Ikdyž všechny tři systémy vykazují velmi podobný vzor histonových modifikací a zastoupení nukleosomů, je třeba brát v potaz na jakém systému je daná studie prováděna, jelikož transkripční aktivita se mezi systémy liší. Transkripce in vivo tak ne vždy odráží transkripci in vitro.

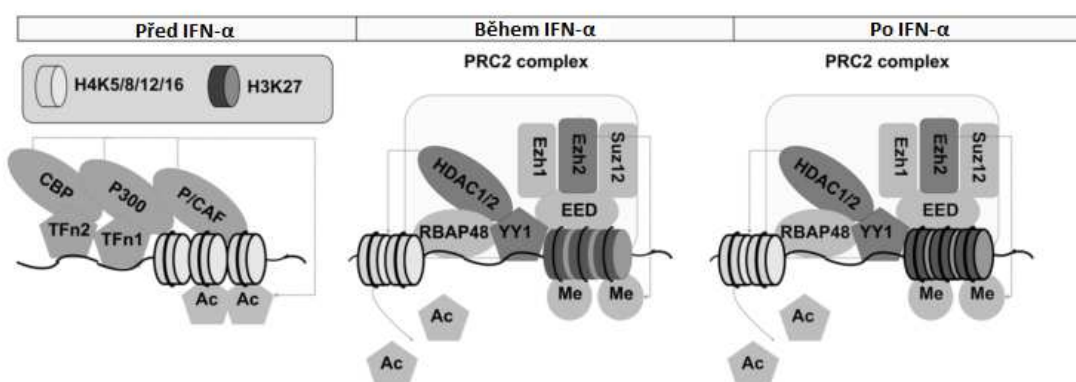
### 3.2.2 Cytokinová regulace modifikací

Cytokiny jsou důležité signální látky, které produkují buňky hrající roli v imunitním systému a skrze které tak mezi sebou komunikují. Mohou reagovat na velkou vzdálenost, ovlivnit buňky, ve kterých jsou produkovány, nebo buňky v těsné blízkosti. Reakcí na různé cytokiny je ovlivnění replikace, transkripce, diferenciaci, růstu a mnoha dalších buněčných dějů. Mechanismem jejich účinku je do značné míry i ovlivnění epigenetických modifikací. Mezi popsání cytokiny snižující replikaci HBV patří IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-4, TNF- $\alpha$ , LT- $\beta$  a TGF- $\beta$ , ale pouze u IFN- $\alpha$  a IL-6 je doposud popsána inhibice transkripce HBV cccDNA zprostředkovaná skrze epigenetické modifikace (Belloni et al., 2012; Chou et al., 2007; Kuo et al., 2009; Lin et al., 2003; Palumbo et al., 2015; Xia et al., 2016; Lucifora et al., 2014).

#### 3.2.2.1 Interferon $\alpha$

IFN- $\alpha$  je cytokin se silnými antivirovými účinky, díky kterým se využívá spolu s nukleotidovými analogy k léčbě HBV. IFN- $\alpha$  nejen že snižuje množství cccDNA v jádře skrze APOBEC3A, ale též blokuje její transkripci a replikaci. Inhibiční účinek IFN- $\alpha$  je spojen s ISRE sekvencí v HBV genomu, které se také nacházejí v genomu buňky a zprostředkovávají transkripci interferonem stimulovaných genů. Mechanismem inhibice transkripce a replikace HBV je v první řadě IFN- $\alpha$  zprostředkovaná hypoacetylace cccDNA vazebných histonů (Belloni et al., 2012), nikoli metylace cccDNA (Liu et al., 2013). Inhibice histon deacetaláz P300/CBP pomocí inhibitoru C646 pak má stejný vliv jako IFN- $\alpha$  a sice inhibici transkripce (Tropberger et al., 2015). Hypoacetylace

histonů způsobí vyšší kondenzaci cccDNA, čímž sníží vazbu transkripčních aktivátorů a naopak umožní vazbu transkripčních represorů. V reakci na IFN- $\alpha$  dochází k vazbě histon deacetyláz (HDAC1, hSirt) a transkripčních represorů (YY1, Ezh2) na cccDNA. Dohromady tyto proteiny vytváří stabilní polycomb represivní komplex (PRC2) (Obrázek č. 8), který je schopen přetrvat i po zastavení léčby interferonem. Vazba YY1 a Ezh2 metyltransferáz může ještě zvýšit schopnost inhibice díky metylaci histonů (Belloni et al., 2012). Nízké hladiny represivních modifikací H3K9me3, H3K27me3 a H3K27me2 však spíše poukazují na to, že za inhibici transkripce HBV cccDNA je s největší pravděpodobností zodpovědný právě PRC2 a jím navozené snížení množství aktivních modifikací (Liu et al., 2013). IFN- $\alpha$  a jím navozená hypoacetylace histonů je tak pravděpodobně i důvodem proč APOBEC3A není schopna zdegradovat všechnu cccDNA. Kondenzace cccDNA snižuje vazbu aktivních transkripčních faktorů a tím i vazbu HBc, na který se APOBEC3B cíleně váže a degraduje tak pouze cccDNA, nikoli hostitelskou DNA.



**Obrázek č. 8** Znárodněnístruktury chromatinu a PRC2 před, během a po podání IFN- $\alpha$ . Před podáním IFN- $\alpha$  jsou histony na cccDNA hyperacetylovány díky přítomnosti acetyltransferáz, konkrétně P300, CBP a P/CAF značící transkripční aktivitu a tím i vysokou replikaci. Během léčby IFN- $\alpha$  dochází k nahrazení acetyltransferáz deacetylázami (HDAC1), vazbě transkripčních represorů (YY1, Ezh) a k hypoacetylaci histonů. Výsledkem je transkripční umlčení, které trvá i po vysazení IFN- $\alpha$ . (Belloni et al., 2012).

### 3.2.2.2 Interleukin 6

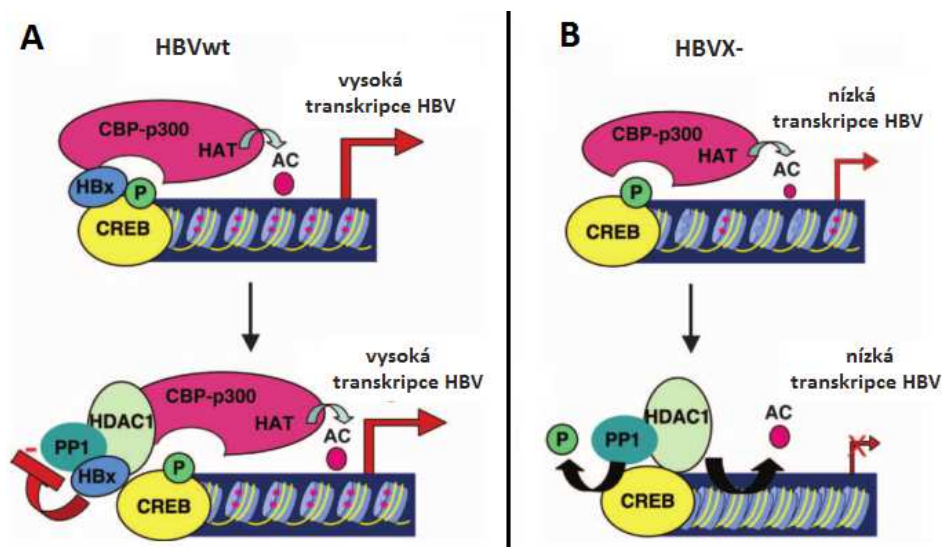
Interleukin 6 (IL-6) je důležitý pro- i protizánětlivý cytokin, jehož zvýšené hladiny byly naměřeny u pacientů s HCC a CHB (Kakumu et al., 1993; Porta et al., 2008). Zaměříme-li se na jeho roli v rámci hepatocytů, tak IL-6 brání poškození jater způsobenému virovou



infekcí, alkoholem, nebo vlastním imunitním systémem a napomáhá jejich regeneraci (Debonera et al., 2001; Tacke et al., 2009). Již několik studií popsalo, že IL-6 inhibuje replikaci a transkripci HBV (Hosel et al., 2009; Kuo et al., 2009). Stejně jako u IFN- $\alpha$ , IL-6 výrazně snižuje množství acetylace na histonu H3 zvýšením hladiny HDAC1. Narozdíl od IFN- $\alpha$  však nemá IL-6 vliv na množství cccDNA v buňce, což svědčí pouze o jeho vlivu na transkripci. Hlavním inhibičním účinkem IL-6 na transkripci cccDNA není pouze hypoacetylace H3, ale hlavně pokles hladin esenciálních transkripčních faktorů STAT3, HNF1 $\alpha$  a HNF4 $\alpha$  vážících se k cccDNA. Jejich důležitost byla potvrzena pomocí siRNA, kdy došlo ke znatelnému poklesu produkce pgRNA (Palumbo et al., 2015; Zheng et al., 2004). Léčba pomocí IL-6 je spojena i se zvýšením hladin miR-24 a miR-629, které jsou potencionálními inhibitory HNF1 $\alpha$  a HNF4 $\alpha$  (Hatziapostolou et al., 2012; Scisciani et al., 2012)

### 3.2.3 Vliv HBx

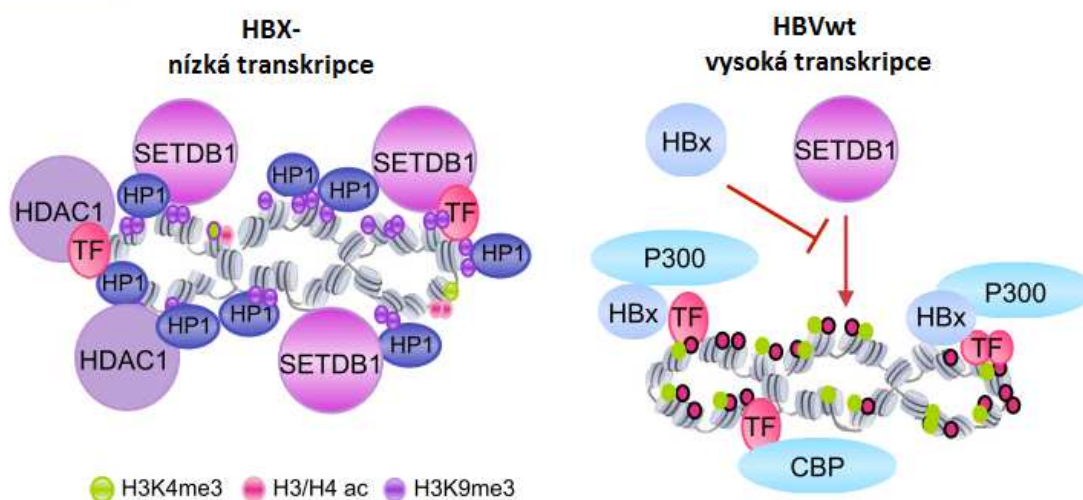
HBx je mimo DNMT3A též schopen interakce s dalšími chromatin modifikujícími enzymy. Příkladem je interakce s CBP/P300 histon acetyltransferázami a jimi navozená tkáňově specifická transkripce několika CREB-regulovaných genů (Obrázek č. 9 A) (Cougot et al., 2007).



**Obrázek č. 9** Role HBx v transkripci cccDNA v porovnání HBx mutantů (HBVX-) a divokého kmene (HBVwt). Vysoká transkripce probíhá u HBVwt díky přítomnosti HAT CBP-P300 a HBx, který inhibuje účinky PP1/HDAC1 a udržuje histony acetylované a cccDNA transkripčně aktivní. U HBX- tak nemůže HBx zabránit defosforylaci CREB a deacetylaci histonů, což vede ke kondenzaci a inhibici transkripce cccDNA (Cougot et al., 2012)



HBx tak dokáže manipulací hostitelských enzymů navodit v buňce příznivý stav pro replikaci viru. Důležitost HBx pro replikaci HBV byla dokázána HBx mutanty, u kterých došlo k vysokému úbytku zastoupení histon acetyltransferáz P300 a naopak k silnému zvýšení hladin histon deacetyláz HDAC1 a hSirt1 navázaných k cccDNA. Tato změna hladin měla za následek pozorovanou hypoacetylaci cccDNA vazebných histonů H4. Ve výsledku HBx mutanty vykazovaly vzhledem k divokému kmeni rychlý pokles replikace a transkripce. (Belloni et al., 2009). Studie Cougot et al., (2012) dosáhla stejných výsledků a popsala bližší mechanismus působení HBx na replikaci HBV (Obrázek č. 9 B). HBx brání fosfatázové aktivitě PP1 a tím defosforylaci transkripčního faktoru CREB, na který se váže CBP HAT důležitá pro replikaci HBV. U HBx mutantů dochází ke snížení množství acetylovaných histonů v důsledku neschopnosti vazby HAT CBP na CREB. Naopak dochází též ke zvýšení represivních modifikací H3K9me2 a H3K9me3 díky SETDB1 metyltransferáze, jejíž aktivita není inhibována interakcí s HBx (Obrázek č. 10). Díky represivním modifikacím též dochází k vazbě heterochromatinového proteinu HP1 jehož vyšší množství napomáhá kondenzaci chromatinu a tím transkripční inhibici (Rivière et al., 2015).



**Obrázek č. 10** Role HBx a SETDB1 v regulaci transkripce cccDNA. U HBVwt je SETDB1 metyl transferáza blokována interakcí s HBx a cccDNA je tak transkripčně aktivní díky vazbě HAT a acetylaci histonů. cccDNA HBX- je tak silně inhibována v důsledku neomezené aktivity SETDB1 vedoucí k inhibiční metylaci histonů H3K9me3, jejich deacetylaci díky HDAC1 a vazbě HP1 navozující strukturu heterochromatinu (Rivière et al., 2015).

HBx mimo jiné blokuje transkripční inhibici cccDNA i díky interakci s antivirovým proteinem Spindlin1, který snižuje množství aktivní modifikace H3K4me3 (Ducroux et al., 2014), a s protein arginin metyltransferázou 1, kde HBx brání její inhibiční metyltransferázové aktivitě (Benhenda et al., 2013). Dohromady tyto poznatky poukazují na to, že HBx je nejen nezbytný pro začátek replikace, ale i pro její dlouhodobé udržení díky interakci s mnoha epigeneticky modifikujícími enzymy, které se tak nemohou vázat k cccDNA a účinně inhibovat její replikaci.

### **3.3 RNA interference**

RNA interference je třetím hlavním epigenetickým mechanismem vrozené imunity buňky proti HBV. Oproti předchozím dvěma, se RNA interference uplatňuje až ve fázi translace. Ta je negativně ovlivněna vazbou microRNA (miRNA/miR) ke komplementárnímu úseku virové mRNA, která tak nemůže být translatována ve virový protein a je následně degradována. Tyto miRNA jsou buňkou kódované kolem 22 nukleotidů dlouhé úseky RNA, které vznikají enzymatickým štěpením z delších sekvencí. Stejně jako acetylace a metylace, i miRNA hraje důležitou roli v diferenciaci buňky a její tkáňové specifitě díky regulaci množství funkční mRNA v různých fázích jejího vývoje. Jejich účinek tak není zaměřen pouze na virovou mRNA, ale též na hostitelskou mRNA, čehož HBV dokáže využít a ne všechny miRNA jsou tak spojeny s negativním účinkem na virovou replikaci (viz Tabulka č. 2).

#### **3.3.1 miRNA blokující replikaci HBV**

Prvním mechanismem inhibice replikace HBV je přímá vazba miRNA na virovou pgRNA a mRNA. Takovou je například miR-125a-5p, miR-125b-5p, miR-199a-3p a miR-210, jejichž cílem je oblast pro HBsAg (Ninomiya et al., 2016; Potenza et al., 2011; Shaw et al., 1979; Zhang et al., 2010). miR-1231 se váže na úsek překryvu genu pro HBx a HBc (Kohno et al., 2014), miR-15a s miR-16-1 se vážou na společný úsek HBx a polymerázy (Wang et al., 2013) a miR-122 interaguje s oblastí genu pro polymerázu a HBc, což celkově vede ke snížení množství HBV DNA (Chen et al., 2011). Nejvíce zastoupená a specifická miRNA v játrech infikovaných HBV je miR-122, jejíž vysoké hladiny kromě přímé interakce s mRNA i nepřímo účinně blokují replikaci HBV, díky interakci s hostitelskými mRNA. miR-122 zvyšuje hladiny hem oxygenázy 1 (HO-1) vedoucí ke snížení hladin HBV cccDNA (Qiu et al., 2010). Cílem miR-122 je i cyklin G1, který

interaguje s p53 a blokuje tak vazbu p53 k HBV enhanceru vedoucí k inhibici replikace HBV (Ori et al., 1998; Wang et al., 2012). miR-122 též blokuje SOCS3, čímž napomáhá k IFN zprostředkované inhibici HBV (Gao et al., 2015). Dalšími buněčnými mRNA, jejichž translace je omezena, jsou mRNA pro peroxizomový receptor (PPAR $\alpha$ ) díky miR-141 (Hu et al., 2012), supresor cytokinové signalizace (SOCS1) a C/EBP, jehož mRNA interaguje s miR-155 (Su et al., 2011; Wang et al., 2009), mRNA pro alfa podjednotku epiteliálního sodného kanálu (SCNN1A) interagující s miR-125b (Zhang et al., 2014b) a mRNA pro CHORDC1, který reguluje duplikaci centrosomu, interaguje s miR-26b (Zhao et al., 2014).

### **3.3.2 miRNA napomáhající replikaci HBV**

Cílem miRNA přispívajících k replikaci HBV jsou nejčastěji mRNA pro hostitelské regulační a antivirové proteiny vrozené imunity. Příkladem je HBx vazebný protein, který je cílem pro miR-501 a nemůže tak blokovat replikaci HBV (Jin et al., 2013). Další sníženou translaci zaznamenáváme u proteinu HNF1 $\alpha$  pomocí miR-15b (Dai et al., 2014), u jaderného faktoru NFIB díky miR-372/373 (Guo et al., 2011b) nebo u estrogenového receptoru  $\alpha$  (ER- $\alpha$ ), jehož mRNA interaguje s miR-18b. Estrogenový receptor tak nebrání HNF1 $\alpha$  ve vazbě k cccDNA (Li et al., 2012; Liu et al., 2009). Exprese některých miRNA je spojena s regulací epigenetických mechanismů, příkladem je miR-1, jejímž cílem je mimo farnesoidového x receptoru  $\alpha$  (FXR $\alpha$ ) i HDAC4 (Zhang et al., 2011) a miR-449a postihující HDAC1 vedoucí k hyperacetylaci cccDNA (Zhang et al., 2013b). miR-152 a miR-101 je spojena s nízkou hladinou DNMT1 a DNMT3A, čímž pasivně brání transkripčnímu umlčení způsobenému metylací CpG ostrovů cccDNA (Huang, et al., 2010; Wei et al., 2013).

Exprese mnoha miRNA je regulována pomocí HBx. Takto regulované miRNA téměř vždy přispívají k replikaci HBV na úkor buňky. Mnoho miRNA je tak spojováno s rozvojem jaterních onemocnění jako je HCC nebo fibróza a cirhóza jater. Hladiny různých miRNA tak mohou sloužit jako dobrý marker, jelikož se jejich míra exprese liší v závislosti na průběhu nemoci.

<b>microRNA</b>	<b>mRNA</b>	<b>Vliv na HBV</b>
miR-1	HDAC1 a FXR $\alpha$	Aktivace
miR-15a	HBx/polymeráza	Inhibice
miR-15b	HNF1 $\alpha$	Aktivace
miR-16-1	HBx/polymeráza	Inhibice
miR-18b	ER- $\alpha$	Aktivace
miR-26b	CHORDC1	Inhibice
miR-101	HDAC1 a FXR $\alpha$	Aktivace
miR-122	HBc/polymeráza, HO-1, cyklin G1, SOCS3	Inhibice Inhibice
miR-125a-5p	HBsAg	Inhibice
miR-125b	SCNN1A	Inhibice
miR-125b-5p	HBsAg	Inhibice
miR-141	PPAR $\alpha$	Inhibice
miR-152	HDAC1 a FXR $\alpha$	Aktivace
miR-155	SOCS1 a C/EBP	Inhibice
miR-199a-3p	HBsAg	Inhibice
miR-210	HBsAg	Inhibice
miR-372/373	NFIB	Aktivace
miR-449a	HDAC1 a FXR $\alpha$	Aktivace
miR-501	HBx vazebný protein	Aktivace
miR-1231	HBx/HBc	Inhibice

**Tabulka č. 2** Seznam zmíněných mikroRNA s jejich cílovou mRNA a vlivem na transkripci a replikaci HBV.

## 4 Závěr

Epigenetickým mechanismům v kontextu regulace transkripce a replikace HBV se v posledních letech dostává stále větší pozornosti. Důvodem je, že epigenetický profil cccDNA v různých fázích infekce se liší a přímo odraží míru replikace a množství virové produkce. První studie zabývající se problematikou epigenetiky HBV se zameřili na metylaci cccDNA. Dokázaly tak, že cccDNA je metylována a že různý metylační vzor odpovídá odlišné virové produkci. Klíčovým úsekem se zde ukázal být druhý CpG ostrov, který nese důležité regulační místa esenciální pro replikaci viru a jehož metylace zastaví virovou transkripci a tím i replikaci. Novější studie se již snaží objasnit úlohu histonových modifikací a jejich roli ve výsledné struktuře chromatinu cccDNA. Mezi hlavní zkoumané modifikace patří acetylace spojená s aktivací transkripce a metylace spojovaná jak s aktivací, tak s inhibicí transkripce. Zastoupení těchto aktivačních a inhibičních značek reguluje vazbu transkripčních faktorů a ve výsledku celkovou transkripci daného úseku. Pro HBV tak platí stejné epigenetické mechanismy jakým je regulován hostitelský genom.

Tyto procesy jsou zároveň obranným mechanismem proti vstupu cizí DNA do buňky, v důsledku kterého dojde k jejímu epigenetickému umlčení, popřípadě její restrikci. X protein kódovaný genomem HBV je však schopen zvrátit oba tyto procesy. Tento multifunkční protein dokáže interakcí s mnoha enzymy modifikujícími chromatin zabránit cílenému umlčení cccDNA a naopak hostitelským epigenetickým mechanismem umlčet hostitelské proteiny inhibující transkripci HBV.

Epigenetická regulace je též pravděpodobně i příčinou okultní fáze hepatitidy B a s ní spojenou perzistencí cccDNA v jádrech hepatocytů. Tato perzistující cccDNA je vysoce kondenzovaná, nepřístupná a transkripčně umlčená množstvím inhibičních modifikací. Chceme-li cccDNA zničit, je třeba ovlivnit její strukturu tak, aby byla transkripčně aktivní a přístupná hostitelským enzymům. Současná cytokinová léčba interferonem sice dokáže takto transkripčně aktivní cccDNA skze APOBEC zdegradovat, avšak IFN též snižuje acetylaci histonů, čímž zároveň podporuje schopnost perzistence cccDNA. Porozumnění epigenetickým mechanismům HBV a možnost jejich cíleného ovlivnění tak může hrát klíčovou roli ve výsledném uzdravení pacientů.

## 5 Seznam použité literatury

- Araki, K., Ichi, J. ichi M., Ken, T. T., Takeaki, I., Tomohisa, I., Kenichi, M., & Ken-ichi, Y. (1989). Demethylation by 5-Azacytidine Results in the Expression of Hepatitis B Virus Surface Antigen in Transgenic Mice. *Jap. J. of Cancer Research*, 80(4), 295–298.
- Belloni, L., Allweiss, L., Guerrieri, F., Pediconi, N., Volz, T., Pollicino, T., ... Levrero, M. (2012). IFN-alpha inhibits HBV transcription and replication in cell culture and in humanized mice by targeting the epigenetic regulation of the nuclear cccDNA minichromosome. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(2), 529–537.
- Belloni, L., Li, L., Palumbo, G. A., Chirapu, S. R., Calvo, L., Finn, M. G., ... Levrero, M. (2014). HAPs hepatitis B virus (HBV) capsid inhibitors prevent HBc interaction with the viral minichromosome and selected host cell genes to inhibits transcription and affect cccDNA stability. *Digestive and Liver Diseases*, 46, e9.
- Belloni, L., Pollicino, T., De Nicola, F., Guerrieri, F., Raffa, G., Fanciulli, M., ... Levrero, M. (2009). Nuclear HBx binds the HBV minichromosome and modifies the epigenetic regulation of cccDNA function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(47), 19975–19979.
- Benhenda, S., Ducroux, A., Riviere, L., Sobhian, B., Ward, M. D., Dion, S., ... Neuveut, C. (2013). Methyltransferase PRMT1 Is a Binding Partner of HBx and a Negative Regulator of Hepatitis B Virus Transcription. *Journal of Virology*, 87(8), 4360–4371.
- Bock, C., Schranz, P., Schroder, C. H., & Zentgraf, H. (1994). Hepatitis B Virus Genome Is Organized into Nucleosomes in the Nucleus of the Infected Cell. *Virus Genes*, 8(3), 215–229.
- Bock, C. T., Schwinn, S., Locarnini, S., Fyfe, J., Manns, M. P., Trautwein, C., & Zentgraf, H. (2001). Structural organization of the hepatitis B virus minichromosome. *Journal of Molecular Biology*, 307(1), 183–196.
- Boyes, J., & Bird, A. (1991). DNA methylation inhibits transcription indirectly via a methyl-CpG binding protein. *Cell*, 64(6), 1123–1134.
- Cougot, D., Allemand, E., Riviere, L., Benhenda, S., Durore, K., Levillayer, F., ... Neuveut, C. (2012). Inhibition of PP1 Phosphatase Activity by HBx: A Mechanism for the Activation of Hepatitis B Virus Transcription. *Science Signaling*, 5(205), ra1–ra1.
- Cougot, D., Wu, Y., Cairo, S., Caramel, J., Renard, C. A., ... Neuveut, C. (2007). The hepatitis B virus X protein functionally interacts with CREB-binding protein/p300 in the regulation of CREB-mediated transcription. *J. of Biol. Chemistry*, 282(7), 4277–4287.
- Cremisi, C., Pignatti, P. F., Croissant, O., & Yaniv, M. (1975). Chromatin-like structures in polyoma virus and simian virus 40 lytic cycle. *Journal of Virology*, 17(1), 204–211.

- Dai, X., Zhang, W., Zhang, H., Sun, S., Yu, H., Guo, Y., ... Zhou, Y. (2014). Modulation of HBV replication by microRNA-15b through targeting hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$ . *Nucleic Acids Research*, 42(10), 6578–6590.
- Debonera, F., Aldeguer, X., Shen, X., Gelman, A. E., Gao, F., Que, X., ... Olthoff, K. M. (2001). Activation of Interleukin-6 / STAT3 and Liver Regeneration Following Transplantation. *Journal of Surgical Research*, 96(2), 289–295.
- Decorsière, A., Mueller, H., van Breugel, P. C., Abdul, F., Gerossier, L., Beran, R. K., ... Strubin, M. (2016). Hepatitis B virus X protein identifies the Smc5/6 complex as a host restriction factor. *Nature*, 531(7594), 386–380.
- Ducroux, A., Benhenda, S., Rivière, L., Semmes, O. J., Benkirane, M., & Neuveut, C. (2014). The Tudor domain protein Spindlin1 is involved in intrinsic antiviral defense against incoming hepatitis B Virus and herpes simplex virus type 1. *PLoS Pathogens*, 10(9), e1004343.
- Favre, M., Breitburd, F., Croissant, O., & Orth, G. (1977). Chromatin-like structures obtained after alkaline disruption of bovine and human papillomaviruses. *Journal of Virology*, 21(3), 1205–9.
- Gao, D., Zhai, A., Qian, J., Li, A., Li, Y., Song, W., ... Zhong, Z. (2015). Down-regulation of suppressor of cytokine signaling 3 by miR-122 enhances interferon-mediated suppression of hepatitis B virus. *Antiviral Research*, 118, 20–28.
- Gish, R. G., Given, B. D., Lai, C.-L., Locarnini, S. A., Lau, J. Y. N., Lewis, D. L., & Schlupe, T. (2015). Chronic hepatitis B: Virology, natural history, current management and a glimpse at future opportunities. *Antiviral Research*, 121, 47–58.
- Guo, H., Liu, H., Mitchelson, K., Rao, H., Luo, M., Xie, L., ... Cheng, J. (2011). MicroRNAs-372/373 promote the expression of hepatitis B virus through the targeting of nuclear factor I/B. *Hepatology*, 54(3), 808–819.
- Guo, Y., Li, Y., Zhao, J., Zhang, J., & Yan, Z. (2011). HBc binds to the CpG islands of HBV cccDNA and promotes an epigenetic permissive state. *Epigenetics*, 6(6), 720–726.
- Guo, Y.-H., Li, Y.-N., Mu, S., Zhang, J., & Yan, Z. (2009). Evidence that methylation of hepatitis B virus covalently closed circular DNA in liver tissues of patients with chronic hepatitis B modulates HBV replication. *Journal of Medical Virology*, 81, 1177–1183.
- Hassa, P. O., Haenni, S. S., Elser, M., & Hottiger, M. O. (2006). Nuclear ADP-Ribosylation Reactions in Mammalian Cells: Where Are We Today and Where Are We Going? *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(3), 789–829.

- Hatzia Apostolou, M., Polytarchou, C., Aggelidou, E., Drakaki, A., Poultides, G. A., Jaeger, S. A., ... Struhl, K. (2012). An HNF4 $\alpha$ -miRNA Inflammatory Feedback Circuit regulates Hepatocellular Oncogenesis. *Cell*, 147(6), 1233–1247.
- Hosel, M., Quasdorff, M., Wiegmann, K., Webb, D., Zedler, U., Broxtermann, M., ... Protzer, U. (2009). Not Interferon, but Interleukin-6 Controls Early Gene Expression in Hepatitis B Virus Infection " 1,2. *Hepatology*, 50(6), 1773–1782.
- Hu, W., Wang, X., Ding, X., Li, Y., Zhang, X., Xie, P., ... Wang, S. (2012). MicroRNA-141 represses HBV replication by targeting PPARA. *PLoS ONE*, 7(3), e34165.
- Huang, J., Wang, Y., Guo, Y., & Sun, S. (2010). Down-regulated microRNA-152 induces aberrant DNA methylation in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma by targeting DNA methyltransferase 1. *Hepatology*, 52(1), 60–70.
- Chen, Y., Shen, A., Rider, P. J., Yu, Y., Wu, K., Mu, Y., ... Wu, J. (2011). A liver-specific microRNA binds to a highly conserved RNA sequence of hepatitis B virus and negatively regulates viral gene expression and replication. *The FASEB Journal*, 25(12), 4511–4521.
- Chou, Y. C., Chen, M. L., Hu, C. P., Chen, Y. L., Chong, C. L., Tsai, Y. L., ... Chang, C. (2007). Transforming growth factor- $\beta$ 1 suppresses hepatitis B virus replication primarily through transcriptional inhibition of pregenomic RNA. *Hepatology*, 46(3), 672–681.
- Jin, J., Tang, S., Xia, L., Du, R., Xie, H., Song, J., ... Fan, D. (2013). MicroRNA-501 promotes HBV replication by targeting HBXIP. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 430(4), 1228–1233.
- Jones, P. L., Veenstra, G. J., Wade, P. a, Vermaak, D., Kass, S. U., Landsberger, N., ... Wolffe, a P. (1998). Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nature Genetics*, 19(2), 187–191.
- Kakumu, S., Shinagawa, T., Ishikawa, T., Yoshioka, K., Wakita, T., & Ida, N. (1993). Interleukin 6 production by peripheral blood mononuclear cells in patients with chronic hepatitis B virus infection and primary biliary cirrhosis. *Gastroenterologia Japonica*, 28(1), 18–24.
- Kim, J. W., Lee, S. H., Park, Y. S., Hwang, J. H., Jeong, S. H., Kim, N., & Lee, D. H. (2011). Replicative activity of hepatitis B virus is negatively associated with methylation of covalently closed circular DNA in advanced hepatitis B virus infection. *Intervirology*, 54, 316–325.
- Kohno, T., Tsuge, M., Murakami, E., Hiraga, N., Abe, H., Miki, D., ... Chayama, K. (2014). Human microRNA hsa-miR-1231 suppresses hepatitis B virus replication by targeting core mRNA. *Journal of Viral Hepatitis*, 21, e89–e97.



- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128, 693–705.
- Kuo, T., Hu, C., Chen, Y., Hong, M., Jeng, S., Liang, C. T., ... Chang, C. (2009). HBV replication is significantly reduced by IL-6. *Journal of Biological Science*, 16(41), 1–9.
- Larsen, F., Gundersen, G., Lopez, R., & Prydz, H. (1992). CpG islands as gene markers in the human genome. *Genomics*, 13, 1095–1107.
- Lempp, F. A., & Urban, S. (2014). Inhibitors of Hepatitis B Virus Attachment and Entry. *Intervirology*, 57, 151–157.
- Levrero, M., Pollicino, T., Petersen, J., Belloni, L., Raimondo, G., & Dandri, M. (2009). Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection. *J. of Hepatology*, 51, 581–92.
- Li, L., Guo, Z., Wang, J., Mao, Y., & Gao, Q. (2012). Serum miR-18a: A potential marker for hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma screening. *Digestive Diseases and Sciences*, 57(11), 2910–2916.
- Lin, S.-J., Shu, P.-Y., Chang, C., Ng, A.-K., & Hu, C. -p. (2003). IL-4 Suppresses the Expression and the Replication of Hepatitis B Virus in the Hepatocellular Carcinoma Cell Line Hep3B. *The Journal of Immunology*, 171(9), 4708–4716.
- Liu, F., Campagna, M., Qi, Y., Zhao, X., Guo, F., Xu, C., ... Guo, J.-T. (2013). Alpha-interferon suppresses hepadnavirus transcription by altering epigenetic modification of cccDNA minichromosomes. *PLoS Pathogens*, 9(9), e1003613.
- Liu, W. H., Yeh, S. H., Lu, C. C., Yu, S. L., Chen, H. Y., Lin, C. Y., ... Chen, P. J. (2009). MicroRNA-18a Prevents Estrogen Receptor- $\alpha$  Expression, Promoting Proliferation of Hepatocellular Carcinoma Cells. *Gastroenterology*, 136(2), 683–693.
- Lucifora, J., Arzberger, S., Durantel, D., Belloni, L., Strubin, M., Levrero, M., ... Medicine, M. (2011). Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection. *Journal of Hepatology*, 55(5), 996–1003.
- Lucifora, J., Xia, Y., Reisinger, F., Zhang, K., Stadler, D., Cheng, X., ... Protzer, U. (2014). Specific and nonhepatotoxic degradation of nuclear hepatitis B virus cccDNA. *Science (New York, N.Y.)*, 343(6176), 1221–8.
- Mogul, D., Torbenson, M., & Schwarz, K. B. (2011). Epigenetic Regulation of Hepatitis B Virus Infection. *Current Hepatitis Reports*, 10(4), 277–284.
- Ninomiya, M., Kondo, Y., Kimura, O., Funayama, R., Nagashima, T., Kogure, T., ... Shimosegawa, T. (2016). The expression of miR-125b-5p is increased in the serum of patients with chronic hepatitis B infection and inhibits the detection of hepatitis B virus surface antigen. *Journal of Viral Hepatitis*, 23, 330–339.

- Ori, A., Zauberman, A., Doitsh, G., Paran, N., Oren, M., & Shaul, Y. (1998). p53 binds and represses the HBV enhancer: An adjacent enhancer element can reverse the transcription effect of p53. *The EMBO Journal*, 17(2), 544–553.
- Palumbo, G. A., Scisciani, C., Pediconi, N., Lupacchini, L., Alfalate, D., Guerrieri, F., ... Belloni, L. (2015). IL6 Inhibits HBV Transcription by Targeting the Epigenetic Control of the Nuclear cccDNA Minichromosome. *Plos One*, 10(11), e0142599.
- Pollicino, T., Belloni, L., Raffa, G., Pediconi, N., Squadrito, G., Raimondo, G., & Levrero, M. (2006). Hepatitis B virus replication is regulated by the acetylation status of hepatitis B virus cccDNA-bound H3 and H4 histones. *Gastroenterology*, 130(3), 823–37.
- Porta, C., De Amici, M., Quaglini, S., Paglino, C., Tagliani, F., Boncimino, A., ... Corazza, G. R. (2008). Circulating interleukin-6 as a tumor marker for hepatocellular carcinoma. *Annals of Oncology*, 19(2), 353–358.
- Potenza, N., Papa, U., Mosca, N., Zerbini, F., Nobile, V., & Russo, A. (2011). Human microRNA hsa-miR-125a-5p interferes with expression of hepatitis B virus surface antigen. *Nucleic Acids Research*, 39(12), 5157–5163.
- Qian, G., Hu, B., Zhou, D., Xuan, Y., Bai, L., & Duan, C. (2015). NIRF, a Novel Ubiquitin Ligase, Inhibits Hepatitis B Virus Replication Through Effect on HBV Core Protein and H3 Histones. *DNA and Cell Biology*, 34(5), 327–332.
- Qian, G., Jin, F., Chang, L., Yang, Y., Peng, H., & Duan, C. (2012). NIRF, a novel ubiquitin ligase, interacts with hepatitis B virus core protein and promotes its degradation. *Biotechnology Letters*, 34(1), 29–36.
- Qiu, L., Fan, H., Jin, W., Zhao, B., Wang, Y., Ju, Y., ... Meng, S. (2010). MiR-122-induced down-regulation of HO-1 negatively affects miR-122-mediated suppression of HBV. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 398(4), 771–777.
- Raimondo, G., Allain, J.-P., Brunetto, M. R., Buendia, M.-A., Chen, D.-S., Colombo, M., ... Zoulim, F. (2008). Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection. *Journal of Hepatology*, 49(4), 652–657.
- Raimondo, G., Caccamo, G., Filomia, R., & Pollicino, T. (2013). Occult HBV infection. *Seminars in Immunopathology*, 35(1), 39–52.
- Rivière, L., Gerossier, L., Ducroux, A., Dion, S., Deng, Q., Michel, M.-L., ... Neuveut, C. (2015). HBx relieves chromatin-mediated transcriptional repression of hepatitis B viral cccDNA involving SETDB1 histone methyltransferase. *Journal of Hepatology*, 63(5), 1093–102.

- Scisciani, C., Pediconi, N., Palumbo, A., Lucifora, J., Guerrieri, F., Rose-John, S., ... Belloni, L. (2012). Il6, Il6-Induced Mirnas and Hnf1a/Hnf4a and the Epigenetic Control of Cccdna Transcription. *Journal of Hepatology*, 56, S2–S18.
- Seeger, C., & Mason, W. S. (2015). Molecular biology of hepatitis B virus infection. *Virology*, 479-480, 672–686.
- Shaw, J. E., Levinger, L. F., & Carter, C. W. (1979). Nucleosomal structure of Epstein-Barr virus DNA in transformed cell lines. *Journal of Virology*, 29(2), 657–665.
- Shlomai, A., de Jong, Y. P., & Rice, C. M. (2014). Virus associated malignancies: the role of viral hepatitis in hepatocellular carcinoma. *Seminars in Cancer Biology*, 26, 78–88.
- Shon, J. K., Shon, B. H., Park, I. Y., Lee, S. U., Fa, L., Chang, K. Y., ... Lee, Y. I. (2009). Hepatitis B virus-X protein recruits histone deacetylase 1 to repress insulin-like growth factor binding protein 3 transcription. *Virus Research*, 139(1), 14–21.
- Su, C., Hou, Z., Zhang, C., Tian, Z., & Zhang, J. (2011). Ectopic expression of microRNA-155 enhances innate antiviral immunity against HBV infection in human hepatoma cells. *Virology Journal*, 8(1), 354.
- Tacke, F., Luedde, T., & Trautwein, C. (2009). Inflammatory Pathways in Liver Homeostasis and Liver Injury. *Clinical Review in Allergy and Immunology*, 36, 4–12.
- Tate, V. E., & Philipson, L. (1979). Parental adenovirus DNA accumulates in nucleosome-like structures in infected cells. *Nucleic Acids Research*, 6(8), 2769–2785.
- Thompson, P. R., & Fast, W. (2006). Histone citrullination by protein arginine deiminase: is arginine methylation a green light or a roadblock? *ACS Chemical Biology*, 1(7), 433–441.
- Tropberger, P., Mercier, A., Robinson, M., Zhong, W., Ganem, D. E., & Holdorf, M. (2015). Mapping of histone modifications in episomal HBV cccDNA uncovers an unusual chromatin organization amenable to epigenetic manipulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, E5715–E5724.
- Tropberger, P., Pott, S., Keller, C., Kamieniarz-Gdula, K., Caron, M., Richter, F., ... Schneider, R. (2013). Regulation of transcription through acetylation of H3K122 on the lateral surface of the histone octamer. *Cell*, 152(4), 859–872.
- Vavouri, T., & Lehner, B. (2012). Human genes with CpG island promoters have a distinct transcription-associated chromatin organization. *Genome Biology*, 13(11), R110.
- Vivekanandan, P., Daniel, H. D. J., Kannangai, R., Martinez-Murillo, F., & Torbenson, M. (2010). Hepatitis B Virus Replication Induces Methylation of both Host and Viral DNA. *Journal of Virology*, 84(9), 4321–4329.

- Vivekanandan, P., Kannangai, R., Ray, S. C., Thomas, D. L., & Torbenson, M. (2008b). Comprehensive Genetic and Epigenetic Analysis of Occult Hepatitis B from Liver Tissue Samples. *Clinical Infectious Diseases*, 46(8), 1227–1236.
- Vivekanandan, P., Thomas, D., & Torbenson, M. (2008a). Hepatitis B viral DNA is methylated in liver tissues. *Journal of Viral Hepatitis*, 15(2), 103–107.
- Vivekanandan, P., Thomas, D., & Torbenson, M. (2009). Methylation Regulates HBV Protein Expression. *Journal of Infectious Diseases*, 199(9), 1286–1291.
- Wang, B., Majumder, S., Nuovo, G., Kutay, H., Volinia, S., Patel, T., ... Jacob, S. T. (2009). Role of microRNA-155 at early stages of hepatocarcinogenesis induced by choline-deficient and amino acid-defined diet in C57BL/6 mice. *Hepatology*, 50(4), 1152–1161.
- Wang, S., Qiu, L., Yan, X., Jin, W., Wang, Y., Chen, L., ... Meng, S. (2012). Loss of microRNA 122 expression in patients with hepatitis B enhances hepatitis B virus replication through cyclin G(1) -modulated P53 activity. *Hepatology*, 55(3), 730–41.
- Wang, Y., Jiang, L., Ji, X., Yang, B., Zhang, Y., & Fu, X. D. (2013). Hepatitis B viral RNA directly mediates down-regulation of the tumor suppressor microRNA miR-15a/miR-16-1 in hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 288(25), 18484–18493.
- Wei, X., Xiang, T., Ren, G., Tan, C., Liu, R., Xu, X., & Wu, Z. (2013). MiR-101 is down-regulated by the hepatitis B virus x protein and induces aberrant DNA methylation by targeting DNA methyltransferase 3A. *Cellular Signalling*, 25(2), 439–446.
- WHO | Hepatitis B. (2016). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>
- Wu, J.-F., & Chang, M.-H. (2015). Natural history of chronic hepatitis B virus infection from infancy to adult life -the mechanism of inflammation triggering and long-term impacts. *Journal of Biomedical Science*, 22(1), 92–99.
- Xia, Y., Stadler, D., Lucifora, J., Reisinger, F., Webb, D., ... Protzer, U. (2016). Interferon-gamma and Tumor Necrosis Factor-alpha Produced by T Cells Reduce the HBV Persistence Form, cccDNA, Without Cytolysis. *Gastroenterology*, 150(1), 194–205.
- Xiang, A., Ren, F., Lei, X., Zhang, J., Guo, R., Lu, Z., & Guo, Y. (2015). The hepatitis B virus (HBV) core protein enhances the transcription activation of CRE via the CRE/CREB/CBP pathway. *Antiviral Research*, 120, 7–15.
- Yan, H., Zhong, G., Xu, G., He, W., Jing, Z., Gao, Z., ... Li, W. (2012). Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *eLife*, 1, e00049.

- Zhang, G. ling, Li, Y. xuan, Zheng, S. qi, Liu, M., Li, X., & Tang, H. (2010). Suppression of hepatitis B virus replication by microRNA-199a-3p and microRNA-210. *Antiviral Research*, 88(2), 169–175.
- Zhang, X., Hou, J., & Lu, M. (2013b). Regulation of hepatitis B virus replication by epigenetic mechanisms and microRNAs. *Frontiers in Genetics*, 4(10), 1–7.
- Zhang, X., Zhang, E., Ma, Z., Pei, R., Jiang, M., Schlaak, J. F., ... Lu, M. (2011). Modulation of hepatitis B virus replication and hepatocyte differentiation by MicroRNA-1. *Hepatology*, 53(5), 1476–1485.
- Zhang, Y., Li, C., Zhang, Y., Zhu, H., Kang, Y., Liu, H., ... Zhang, J. (2013a). Comparative Analysis of CpG Islands among HBV Genotypes. *PLoS ONE*, 8(2), e56711.
- Zhang, Y., Mao, R., Yan, R., Cai, D., Zhang, Y., Zhu, H., ... Zhang, J. (2014a). Transcription of Hepatitis B Virus Covalently Closed Circular DNA Is Regulated by CpG Methylation during Chronic Infection. *PLoS ONE*, 9(10), e110442.
- Zhang, Z., Chen, J., He, Y., Zhan, X., Zhao, R., Huang, Y., ... Liu, Q. (2014b). miR-125b inhibits hepatitis B virus expression in vitro through targeting of the SCNN1A gene. *Archives of Virology*, 159(12), 3335–3343.
- Zhao, F., Xu, G., Zhou, Y., Wang, L., Xie, J., Ren, S., ... Zhu, Y. (2014). MicroRNA-26b inhibits hepatitis B virus transcription and replication by targeting the host factor CHORDC1 protein. *Journal of Biological Chemistry*, 289(50), 35029–35041.
- Zheng, D.-L., Zhang, L., Cheng, N., Xu, X., Deng, Q., Teng, X.-M., ... Han, Z.-G. (2009). Epigenetic modification induced by hepatitis B virus X protein via interaction with de novo DNA methyltransferase DNMT3A. *Journal of Hepatology*, 50(2), 377–387.
- Zheng, Y., Li, J., & Ou, J. (2004). Regulation of Hepatitis B Virus Core Promoter by Transcription Factors HNF1 and HNF4 and the Viral X Protein Regulation of Hepatitis B Virus Core Promoter by Transcription Factors HNF1 and HNF4 and the Viral X Protein. *Journal of Virology*, 78(13), 6908–6914.
- Zhu, Y., Zhu, R., Fan, J., Pan, Q., Li, H., Chen, Q., & Zhu, H. (2010). Hepatitis B virus X protein induces hypermethylation of p16 INK4A promoter via DNA methyltransferases in the early stage of HBV-associated hepatocarcinogenesis. *Journal of Viral Hepatitis*, 17, 98–107.